

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"Acción antioxidante del aceite de germen de trigo"

Tesis presentada para optar  
al grado de  
Doctor en Química  
por  
OSVALDO ANZALDI

Trabajo realizado  
en el laboratorio  
de Química Tecno-  
lógica II C.y en  
parte en el labora-  
torio Swift La Plata.



A mis padres y hermanos.



Padrino de Tesis

Profesor Doctor Jerónimo Angli

Señor Delegado Interventor,

Señores Profesores:

Someto a vuestra consideración este mi trabajo, que he titulado "Acción antioxidante del aceite de germen de trigo".

El mismo fué realizado en el laboratorio de Química Tecnológica II C. y en parte en el laboratorio Swift La Plata.

Agradezco al señor profesor Dr. Jerónimo Angli el honor que me ha conferido al apadrinarme en esta Tesis.

Además deseo expresar mi más sincera gratitud al señor Víctor Tellechea, Jefe del laboratorio Químico de la Compañía Swift La Plata, por haberme permitido realizar parte de mis experiencias en ese laboratorio.

Quedo asimismo, muy reconocido a todos mis profesores y demás personal docente de esta Facultad, que han sabido inculcarme los conocimientos científicos.

La Plata, agosto 13 de 1948.

## SUMARIO

Capítulo I: Introducción y generalidades.

Capítulo II: Influencia del aceite de germen de trigo sobre la estabilidad de la grasa de cerdo.

Capítulo III: Acción sinérgica del ácido cítrico sobre los tocoferoles contenidos en el aceite de germen de trigo.

Capítulo IV: Acción del  $\alpha$ -tocoferol puro sobre la estabilidad de la grasa de cerdo.

Capítulo V: Algunos ensayos de almacenaje.

Conclusiones.

Bibliografía.

CAPITULO 1

Introducción y Generalidades.

El estudio de la rancidez de grasas comestibles, y el tratamiento de éstas con antioxidantes convenientes o adecuados, ha sido motivo de especial interés, principalmente en estos últimos tiempos, a raíz de la reciente contienda mundial, en que los países actores tenían el problema de la conservación y envío de las sustancias grasas, a los soldados combatientes en lugares distantes.

La rancidez en grasas no solamente vuelve impalatable los alimentos, sino que también puede ser la causa de la destrucción parcial de los ácidos grasos esenciales y de las vitaminas tales como la A, la E, quizá la D, y ciertos miembros del complejo B. Antiguamente el término rancidez se empleaba en un sentido general para indicar deteriorización en el olor y en el sabor, o exclusivamente para algún tipo particular de inutilización.

Las grasas pueden desarrollar olores y sabores desagradables por la absorción de olores, la acción de enzimas, la acción de microorganismos, o por la oxidación atmosférica. (1).

Los alimentos de alto contenido graso y sabor agradable pueden ser particularmente susceptibles de inutilización por absorción de olores, debido quizás, a la fácil solubilidad de la mayoría de las sustancias olorosas naturales en un substrato graso. Como caso típico puede mencionarse la inutilización de la manteca, la yema de huevo y la grasa de la carne por frutas (2).

La deteriorización de grasas y aceites por desarrollo de rancidez puede sintéticamente clasificarse dentro de tres tipos principales: oxidativa, hidrolítica y cetónica.

La rancidez oxidativa que se produce por la adición de oxígeno molecular a los glicéridos no saturados, originándose peróxidos o moléculas que se descomponen espontáneamente o reaccionan con el agua para formar aldehídos, cetonas y ácidos grasos.

La rancidez hidrolítica que se produce principalmente por la hidrólisis de los glicéridos con la formación de ácidos grasos libres.

La rancidez cetónica que de acuerdo a Tiebold (1913) tiene lugar en grasas conteniendo impurezas nitrogenadas que se deben a ciertos mohos, los que actuando sobre los ácidos grasos saturados de bajo peso molecular producen metil cetonas como productos finales. Puesto que las cetonas no pueden ser producidas por la acción de microorganismos sobre los ácidos de peso molecular más alto que el mirístico y solamente rastros y en condiciones muy favorables de éste, podemos decir que la mayoría de las grasas comunes de los alimentos, que no contienen cantidades apreciables de ácidos de peso molecular más bajo que el mirístico, no desarrollan rancidez cetónica.

El desarrollo y progreso de la rancidez producida por la acción del oxígeno puede acelerarse por la luz, calor y ciertos metales, tales como el cobre, zinc, etc., los cuales actúan como catalizadores. Nosotros nos limitaremos a aplicar el término rancidez al desarrollo de olor y sabor desagradables, producidos en una grasa por la acción del oxígeno atmosférico. Experimentalmente esto ocurre en seguida del final del período de inducción. Si hacemos un gráfico en el que en las ordenadas representamos la

cantidad de oxígeno absorbido por una grasa y en las abscisas el tiempo, encontraríamos un período inicial, en el que la cantidad de oxígeno absorbido es baja, después de este período, la cantidad de oxígeno absorbido aumentaría en una forma bastante rápida y esto marca el final de lo que se ha convenido en conocer como el período de inducción de una grasa.

Esta condición se observa en el gráfico como un aumento rápido en la curva. Inmediatamente después que se ha alcanzado este punto, las muestras se convierten en organolépticamente rancias. El efecto de un antioxidante es prolongar el período de inducción, es decir, que se retardaría la llegada de la absorción rápida de oxígeno.

Igualmente podemos considerar que la estabilidad se refiere a una medida del grado o extensión, en el cual las sustancias grasas resisten el desarrollo de la rancidez oxidativa y ella nos da una medida de la longitud del período de inducción.

La estabilidad de una grasa o de un aceite se expresa corrientemente como el tiempo que transcurre bajo condiciones específicas antes que la grasa o el aceite se conviertan en rancias.

Sin detenernos a resumir la literatura disponible nos limitaremos a considerar el hecho de que el análisis final de la rancidez debe ser descubierto a través de observaciones organolépticas. Este tipo de ensayo, está sometido a todos los errores inherentes a un ensayo que involucra criterio personal.



No se ha ideado ningún ensayo químico con el cual pueda medirse exactamente y correlacionar todos los factores que actúan simultáneamente para producir el olor y el sabor de lo que llamamos rancidez. De los varios ensayos que se han citado el de oxígeno activo o del contenido de peróxidos parece dar bastante correlación de datos.

Durante la oxidación de una grasa se forman ciertos compuestos del oxígeno, los cuales son activos en el sentido de que ellos son capaces de liberar iodo del ioduro de potasio. El iodo puede ser determinado cuantitativamente con una solución valorada de tiosulfato de sodio y así se obtiene una medida de la rancidez.

Parecería entonces que para hallar la estabilidad de una grasa se determinaría simplemente el contenido de peróxidos a intervalos arbitrarios y cuando el contenido de peróxidos alcanzara un valor dado, la muestra se considerara rancia.

Debemos tener presente que los olores propios de la rancidez no son producidos por los peróxidos, sino que son causados por los productos de descomposición resultante en parte de su acción. La velocidad de descomposición depende de la temperatura, así, si determinamos la rancidez de una grasa por su contenido en peróxidos, debemos considerar la temperatura del ensayo, puesto que el contenido de peróxidos puede alcanzar valores muy altos a bajas temperaturas, antes que la descomposición se convierta en suficientemente rápida para ser notada organolépticamente.

Considerando el problema de determinar la estabilidad, se observa que las grasas se vuelven rancias tan lentamente en las condiciones ordinarias de almacenaje, que tendríamos que esperar meses y aún años, para saber la estabilidad de una grasa dada.

Se necesitaría un método acelerado para producir el desarrollo de la rancidez, el cual permitiría determinar las estabildades relativas. Básicamente, todos los métodos que han sido empleados en la determinación de las estabildades de las grasas, son, en principio, semejantes. La oxidación de una grasa puede acelerarse bajo condiciones cuidadosamente controladas, de manera de poder reducir el tiempo necesario para producir la rancidez de meses o semanas en horas o en días.

El aumento de la velocidad de oxidación de una grasa puede ser causada por calentamiento a una temperatura constante entre 40 y 100° C en una atmósfera de oxígeno o aire. Algunas veces se ha empleado la acción de la luz o la acción catalítica producida por rastros de sales metálicas y ayudadas frecuentemente por el empleo de altas temperaturas. El progreso de la oxidación acelerada se puede seguir por el olor y el sabor; midiendo directamente el volumen de oxígeno absorbido o por la estimación de algunos de los productos de la reacción (pe. los peróxidos). En todos estos métodos acelerados es extremadamente importante, calibrar el método con el tipo particular de grasa que se estudia.

Los métodos rápidos más impor-



tantes usados para determinar las estabilidades de las grasas y de los aceites son: el de oxígeno activo (ensayo de estabilidad Swift), el de absorción de oxígeno y el de incubación en horno (3).

El método usado en nuestras experiencias se describirá en detalle en la primera parte. Antes de entrar en ella convendría hacer un resumen de lo que es un antioxidante y cuales son los más comunes que se aplican para mejorar las grasas animales y vegetales.

Por los estudios realizados en el año 1930 (4) y en el año 1931 (5) se ha llegado a la conclusión de que las funciones de lípidos no saponificables de los aceites vegetales contienen compuestos que son antioxidantes activos para la grasa de cerdo (6).

El hecho de que los aceites presentes en nueces y en otros tejidos vegetales y aún animales expuestos al aire y a la luz no se conviertan en rancios, puntualiza la existencia de un mecanismo que los protege de la oxidación, ya sea por el mantenimiento de la concentración en un nivel extremadamente bajo del oxígeno en contacto con la grasa, o por la formación de sustancias que inhiben la oxidación.

La primera indicación experimental de la presencia de tales inhibidores en ciertos aceites, pareció haber sido obtenida de la observación que la destrucción oxidativa de las vitaminas liposolubles A y especialmente la E en dietas experimentales, se retarda grandemente, cuando las grasas animales tales como la grasa de cerdo y el aceite de hígado

de bacalao se reemplazaban o se suplementaban por aceites vegetales de igual o de mayor insaturación (7).

Los trabajos subsiguientes efectuados, han demostrado la asociación de estas vitaminas con inhibidores, en un gran número de tejidos vegetales. Estos inhibidores prolongarían el período de inducción de las grasas y nos darían alguna confirmación a la teoría de que las vitaminas (y caroteno) deben su supervivencia, en un medio por otra parte tan favorable a la oxidación, a la protección suministrada por los antioxidantes (8).

La observación posterior de que los glicéridos resintetizados de los constituyentes ácidos grasos (después de la destilación) de varios aceites naturales son mucho menos resistentes a la oxidación que los aceites mismos (10), nos da la pauta de que las sustancias inhibidoras se encuentran en los aceites originales.

La destrucción de los antioxidantes naturales, durante los procesos ordinarios de extracción y refinamiento de los aceites, conduce a una reducción muy pronunciada en la resistencia potencial de los mismos a la oxidación. Los álcalis, los agentes decolorantes y la aereación a temperaturas altas, destruyen los antioxidantes naturales.

Mattill y Crawford (4) separando aceites de germen de maíz en sus constituyentes saponificables y no saponificables concentraron la actividad antioxidante en los últimos. La fracción insaponificable del aceite corresponde al 2% del mismo y se comprobó que tenía notables propiedades antioxidantes

cuando se le agregaba a otras grasas.

La acetilación de esta fracción destruye completamente su actividad, pero ésta puede ser grandemente regenerada por subsiguiente hidrólisis. Este hecho es por demás concluyente para indicarnos que los antioxidantes del aceite de germen de maíz son compuestos hidroxilos. Los antioxidantes naturales, cuya actividad depende de grupos hidroxilos libres, pueden ser concentrados en las fracciones insaponificables de los aceites vegetales, tales como el aceite de germen de trigo, de maíz, de algodón y de palma.

También podemos decir que ellos no son esteroides, puesto que todos los esteroides conocidos, presentes en los aceites, son inactivos como antioxidantes (4) y (9).

Olcott y Mattill (6), (11) y (12) propusieron para los constituyentes activos de estos concentrados, el nombre de inhibitoles a fin de indicar su función como inhibidor y también la presencia invariable de grupos hidroxilos, de los cuales, depende su actividad.

La concentración y propiedades de los inhibitoles fueron descritas en trabajos posteriores (6), pero no se pudo obtener ningún compuesto puro.

Los concentrados de inhibitoles obtenidos de diferentes fuentes son aceites amarillos, brillantes, viscosos, que pueden conservarse durante años bajo las condiciones ordinarias del laboratorio. Estos concentrados pueden ser destruidos por los reactivos que atacan los grupos hidroxilos, pero en el caso de formación de ésteres su actividad puede

ser grandemente regenerada por hidrólisis.

Los inhibitoles parecen tener por lo menos una doble ligadura, puesto que cuando reaccionan con los halógenos, ya sea cloro o bromo, pierden su actividad, la cual puede ser regenerada por reducción (hirviendo con zinc y ácido clorhídrico en metanol).

Olcott y Mattill (6) sometieron una muestra a hidrogenación a 250° C y a 230-280 atm. durante dos horas sin pérdida de su actividad. El material recuperado era aún no saturado aunque el número de iodo se había reducido de 105 a 70. El ácido perbenzoico destruye en frío, a los inhibitoles, como así también el ozono.

Todas estas experiencias nos indican que los inhibitoles contienen una doble ligadura, difícil de ser hidrogenada, la cual sería esencial para su actividad. Los métodos usados para determinar el efecto de estos reactivos sobre los concentrados de inhibitoles han sido descriptos sucintamente en otra parte (13) y (14). Los concentrados de inhibitoles presentan una absorción máxima en el espectro a 2940 Å (12).

Seguendo la aislación de la vitamina E hecha por Emerson y en otra parte (15), se encontró que los tocoferoles puros poseen marcada actividad antioxidante (16).

Parece justificado concluir que algunas, sino la mayoría de las actividades antioxidantes, presentes en las porciones insaponificables de lípidos vegetales pueden atribuirse a los tocoferoles. Sin embargo, debemos hacer notar que la actividad antioxidante de los tocoferoles no es paralela a su

actividad biológica como vitamina E.

El más activo como antioxidante, es el  $\gamma$  según Fisher (17) tres veces más que el  $\alpha$ , siendo el  $\beta$  intermedio. El  $\beta$  y el  $\gamma$  son dos veces y media menos activos biológicamente que el  $\alpha$ . Esta falta de correlación entre las propiedades antioxidantes y propiedades vitamínicas, nos da una explicación de la falta de relaciones directas que habían sido observadas anteriormente en los concentrados (9) y (16).

Se han descrito concentrados de vitamina E virtualmente libres de actividad antioxidante (5) y (9). Podemos explicar estos resultados suponiendo que las preparaciones no estaban completamente hidrolizadas. Los ésteres simples de los tocoferoles son efectivos como vitamina E, pero ineficaces como antioxidantes. La posibilidad de que la vitamina E pueda encontrarse en la naturaleza en la forma de un éster ha sido sugerida previamente (14).

Como ya sabemos, tanto la acción antioxidante de los inhibitoles como la de otros inhibidores de estructura conocida, depende de la presencia de un grupo hidroxilo en su molécula, por consiguiente la actividad antioxidante de los alofanatos de tocoferoles no se esperaba. Este hecho puede ser explicado por la enolización de uno de los átomos de hidrógeno del grupo alofanilo (18).

Cuando se emplearon los aceites vegetales como sustrato de grasa, mas bien que como fuente de concentrados antioxidantes (para la grasa de cerdo), se descubrió que las fracciones de inhibitoles eran relativamente inac-



tivas en las grasas y en los aceites de las cuales ellas habían sido extraídas (11). Se hicieron experimentos, que demostraron que un concentrado de inhibidores era ineficaz para el aceite de algodón, en cambio, cuando una quinta parte de la cantidad usada se adicionaba a la grasa de cerdo, se duplicaba su período de inducción (tales resultados pueden observarse en la Tabla N° 1).

Hay una diferencia esencial en el funcionamiento de la grasa de cerdo y en el funcionamiento del aceite de algodón hidrogenado. En el primero la absorción de oxígeno y la acumulación de peróxidos es muy pequeña durante el período de inducción. El agregado de antioxidantes prolonga esta fase con un final fácilmente determinado, puesto que la llegada del período de absorción rápida puede ser notado rápidamente.

Con el aceite de algodón hidrogenado se observa que éste, a través del período de inducción, acumula peróxidos y absorbe oxígeno muy lentamente. Los ensayos de laboratorio sobre antioxidantes se puede seguir más fácilmente con tipos de grasa de cerdo que con los aceites vegetales, puesto que el final del período de inducción puede determinarse con mayor exactitud. Otras grasas animales, ácidos grasos grandemente purificados (destilados) y ésteres se comportan igual que la grasa de cerdo, mientras que los aceites vegetales como el de algodón, oliva, sésamo y otros, tienen las mismas propiedades que el aceite de algodón hidrogenado.

T A B L A    N<sup>o</sup> 1.Efecto de los concentrados de inhibidores sobre diferentes grasas.

<u>Substrato</u>	<u>Concentración de</u> <u>concentrado de i-</u> <u>nhibidores agregado.</u>	<u>Periodo de inducción</u>	
		<u>Con inhibidores</u>	<u>Sin inhibidores</u>
	%	Días	Días
Aceite de algodón	0,05	3	3,5
	0,05	6,5	8,0
Grasa de cerdo	0,01	11	4
	0,02	9	3

Las esterificaciones con alcohol metílico suministran un método satisfactorio para modificar los aceites vegetales, de modo que ellos pueden ser ensayados por el método de absorción de oxígeno sin cambiar sus reacciones inherentes para con los inhibidores.

Así Olcott y Mattill usaron como substrato crudo (no destilado) ésteres de aceite de algodón u otro aceite vegetal preparado por directa esterificación de la grasa con alcohol metílico y ácido clorhídrico. Estos ésteres crudos se oxidan más rápidamente y con un período de inducción más agudo que la grasa original, pero exhiben un funcionamiento cualitativo similar hacia los antioxidantes.

Ellos no eran protegidos por los concentrados de inhibidores pero se estabilizan en un grado remarkable con varios ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos.

No puede obtenerse ninguna conclusión general con relación a la actividad de ácidos inorgánicos. Aunque los ácidos sulfúrico y fosfórico son activos, los ácidos clorhídricos, iodídrico, nítrico y bórico son inactivos.

Los ácidos orgánicos alifáticos dicarboxílicos de más de tres átomos de carbono son inactivos si no tienen en su molécula por lo menos un grupo o varios grupos activos, tales como grupos hidroxilos o doble ligaduras.

Si los grupos carboxílicos de un ácido activo, tal como el tartárico, eran neutralizados o esterificados, la actividad era perdida. Así en los casos de los ácidos, la actividad parece depender de la presencia de grupos hidroxilos libres capaces de separar iones hidrógeno.

A fin de investigar el problema más ampliamente, las preparaciones de ésteres crudos eran cuidadosamente destiladas en el vacío. El 95 a 98% de los ésteres destilaban fácilmente y sin destrucción.

Cuando las fracciones destiladas se usaban como sustrato de grasa, en ensayo de antioxidantes, se encontró que ellas se comportaban completamente diferente a lo que lo hacían los ésteres crudos. Estas fracciones recuerdan a la grasa de cerdo y pueden ser protegidas por los inhibidores, pero no por los inhibidores de tipo ácido.

De todo esto se puede concluir que el inhibidor original presente en el aceite vegetal, queda en el residuo cuando los ésteres crudos son destilados, y que a él se debe la mayor acción antioxidante de los inhibidores del tipo ácido en los ésteres crudos. Cuando se ensayan conjuntamente inhibidores



e inhibidores del tipo ácido, se encontró que estos últimos producían un aumento en la protección conferida por los primeros.

El sinergismo es ilustrado en la Tabla Nº II.

T A B L A    Nº II.   

Acción sinérgica de los Ácidos sobre los concentrados de inhibidores

<u>Porcentaje de inhibidor</u> <u>agregado</u> %	<u>Periodo de Inducción</u>	
	<u>Con inhibidor</u>	<u>Sin inhibidor</u>
	Horas	Horas
<u>Destilados de ésteres</u>		
<u>de etilo.</u>		
0,04% de concentrado de inhibidores.	9,5	5
0,10% de ácido tartárico	8,0	5
0,04% de concentrado de inhibidores más 0,10 % de ácido tartárico.	148,0	5
<u>Grasa de cerdo.</u>		
0,02 % de orcinol.	75	12
0,10% de ácido fosfórico	21	12
0,02% de orcinol más 0,10% de ácido fosfórico.	314	12
0,02% de ácido ascórbico	23	12
0,02% de X tocoferol	75	12
0,02% de ácido ascórbico más 0,02% de X tocoferol	180	12

En cada caso el uso de dos anti-oxidantes juntos da una protección en exceso comparándola con la que puede ser esperada de los resultados obtenidos usando cada uno separadamente.

Ultimamente se encontró que no solamente los inhibidores, sino también ciertos otros compuestos fenólicos, fomentan la eficacia de los inhibidores del tipo ácido.

En particular y para ilustrar, los resultados de orcinol y ácido fosfórico en grasa de cerdo, son especialmente notables. Una tentativa de clasificación se basa sobre los trabajos descriptos y se esboza en el esquema siguiente:

Tentativa de clasificación de los tres tipos de inhibidores.

	<u>Aceite</u> <u>vegetal</u>	<u>Esteres</u> <u>crudos</u>	<u>Esteres</u> <u>destilados</u>	<u>Grasa de cerdo,</u> <u>ésteres de á-</u> <u>cidos grasos</u> <u>de la grasa de</u> <u>cerdo, purifi-</u> <u>cados.</u>
<u>Tipo ácido.</u>	+	+	-	-
<u>Inhibidores e</u> <u>hidroquinona</u>	-	-	+	+
<u>Tipo fenólico,</u> <u>naftol, pirogalol,</u> <u>catecol.</u>	+	+	+	+

En general puede decirse que

"Un inhibidor ácido fomentaría, energizaría la acción de cualquier inhibidor fenólico".

Súnamente interesante es el hecho de que el ácido ascórbico, vitamina C, posea actividad antioxidante del tipo ácido, mientras que los tocoferoles, esto es, vitamina E, posean las propiedades asignadas a los inhibidores fenólicos.

Teóricamente las combinaciones de los dos antioxidantes serían particularmente ventajosas, y en la actualidad la estadística confirma tal presunción (Tabla N<sup>o</sup> II).

El objeto de nuestro trabajo, en su primera parte, es comprobar la acción antioxidante del aceite de germen de trigo sobre la grasa de cerdo y buscar la concentración óptima en la que produce la estabilidad máxima.

La segunda parte consiste en ver la acción sinérgica de los inhibidores ácidos sobre los fenólicos, para lo cual hemos empleado el ácido cítrico por ser el más recomendado en la literatura a causa de su mejor solubilidad en los solventes grasos.

La tercera parte de nuestra investigación consiste en ensayar ~~X~~ tocoferol puro sobre la misma grasa de cerdo para comprobar si en el aceite de germen de trigo existen sustancias que favorecen la acción de los tocoferoles.

Finalmente se hicieron algunos ensayos de almacenaje con el propósito de ver, si a través del tiempo, variaba o no la estabilidad conferida por el aceite.

Las muestras de aceite de germen de trigo fueron gentilmente cedidas por el Dr. Oscar Raúl Vera.

## - C A P I T U L O   I I -

Influencia del aceite de permen de trigo sobre  
la estabilidad de la grasa de cerdo

Para llegar a determinar el mejoramiento en la estabilidad de la grasa de cerdo por el agregado de aceite de germen de trigo se usó el método de absorción de oxígeno.

Trataremos de recordar que se entiende por período de inducción de una grasa o de un aceite, a pesar de haber sido explicado en la Introducción. El objeto de esto es entender mejor la descripción y funcionamiento del aparato utilizado.

Cuando las grasas y los aceites son expuestos al aire absorben gradualmente oxígeno con la formación de peróxidos, dependiendo la velocidad de absorción de un número de factores, tales como la característica de la grasa expuesta y el acceso de luz.

Se encontraría un período inicial durante el cual la velocidad de absorción de oxígeno es bajo, después de éste la velocidad aumentaría en una manera bastante rápido y esto marca el final de los que se ha convenido en llamar período de inducción.

El final de este período es además coincidente con el tiempo cuando la deterioración del sabor se hace marcadamente aparente, es decir, que la rancidez oxidativa se vuelve organolépticamente perceptible.

El método usado en este trabajo es el método de absorción de oxígeno. El ensayo se realiza exponiendo una cantidad de grasa caliente a una temperatura constante en un mecanismo que regula la velocidad de agitación de

oxígeno y conectando el balón donde se realiza el ensayo a un manómetro (Un tubo en U lleno de mercurio).

En nuestra investigación la medida de absorción por la contracción del oxígeno en el balón donde se realiza el ensayo está indicada por la altura de la columna de mercurio del manómetro.

El particular valor de esto descansa en el hecho de que los resultados de absorción de oxígeno se obtienen sin la necesidad de determinar el número de peróxidos y por el simple medio de hacer lecturas manométricas, las que pueden ser repetidas a intervalos deseados sin tener que aumentar el número de tubos o el tamaño de los aparatos que ensayan rancidez.

Antes de emplear este método se usaba el método de oxígeno activo conocido como ensayo de rancidez acelerada Swift (20). Haremos una descripción somera del mismo.

Consistía en hacer burbujear aire cuidadosamente limpio a través de la grasa, la que era mantenida a la temperatura del agua en ebullición. La muestra era ensayada organolépticamente a intervalos frecuentemente regulares y cuando el aire que pasaba a través de la misma adquiría un olor rancio, determinaciones del contenido de peróxidos se hacían sobre ella. La grasa se colocaba en tubos perfectamente calibrados y se determinaba en cada tubo el valor de los peróxidos, se dibujaba la curva "tiempo-peróxido" marcando sobre ella el punto en el cual la rancidez se ponía de manifiesto, por el olor. Para estudiar mejor las distintas curvas se con-

tinuaba la experiencia de acuerdo al número de tubos que se dispusiera, aún cuando, la rancidez se hubiera desarrollado en los primeros tubos.

Con el método de absorción de oxígeno el problema que faltaba determinar era el punto de ruptura (el punto donde se ponía de manifiesto la rancidez organoléptica) de la curva sin tener que recurrir a los ensayos organolépticos.

Se ha demostrado que esto es posible por la investigación de Sylvester y otros (20), quienes han comprobado que en las curvas de estructura similar los puntos de ruptura ocupan una posición determinada y que los puntos teóricos así determinados concuerdan en una exactitud remarkable con el punto observado actualmente, en donde comienza la rancidez perceptible.

Los valores de estabilidad pueden ser establecidos en lecturas manométricas estrechamente espaciadas en vez de análisis químicos de dudosa realidad.

Aparte de la más grande exactitud promisoría el método manométrico (de absorción de oxígeno), es de fácil manipuleo y bajo costo; en cuanto a lo que nosotros podemos decir en el presente en relación a la rancidez perceptible es que en el método de Swift puede ocurrir donde a través de los cálculos, el punto de ruptura, es establecido como existente aún cuando no es todavía perceptible a los sentidos.

El aparato usado consiste de un baño de aceite y agua calentado eléctricamente; una plataforma movable activada eléctricamente, que sostiene los balones de



ensayo en los cuales las grasas están sometidas a la acción del oxígeno; manómetros que registran el vacío por la absorción de oxígeno y un cilindro de este gas (en lugar del cilindro de oxígeno, por ser mucho más cómodo se usa una cámara de auto, la cual se llena de oxígeno).

El baño de aceite consiste de un recipiente de doble fondo; en la parte inferior circula agua y en la parte superior se encuentra un aceite mineral. El agua del baño es calentada por medio de una resistencia eléctrica, una gran resistencia para mantener la temperatura hasta el punto de ebullición del agua y una pequeña resistencia para mantener el baño de aceite a la temperatura de 100° C. Un refrigerante a reflujo mantiene constante el nivel del agua.

Plataforma que soporta los frascos de absorción.

La plataforma ajusta cuatro balones, los cuales están mantenidos en posición fija por medio de grapas y permiten así colocar los balones en el baño de aceite sin la necesidad de alzar la plataforma del baño.

La plataforma descansa por su propio peso sobre guías y está conectada por una varilla de transmisión a un motor impulsado por un excéntrico el cual desliza la plataforma horizontalmente de un extremo a otro con una velocidad que puede variarse entre 75 y 85 movimientos por minuto. La velocidad "standard" es de 80 movimientos por minuto.

Manómetros:

El tablero de manómetro ajusta cuatro manómetros de vidrio (uno para cada balón de Kjeldahl) y un indicador de vacío. Los manómetros están llenos de



mercurio y son de un tamaño para registrar 200 mm de presión negativa y deben ser todos del mismo diámetro tubular.

El indicador de vacío se usa para controlar la carga de oxígeno en los balones Kjeldahl.

Balones de Kjeldahl:

Estos son de 300 cm. de capacidad, y seleccionados por su uniformidad de diámetro y curvatura.

A fin de hacer el equipo tan compacto como sea posible, sus cuellos han sido acortados de modo que no sobresalgan más de cinco cm. arriba de las grapas de la plataforma portante, cuando el fondo del balón está un cm. arriba del fondo del pozo del aceite.

Los balones Kjeldahl están cerrados por tapones de goma como muestra el esquema adjunto.

Procedimiento:

a) Controlar la temperatura correcta del baño de aceite a 100°C y ajustarla si es necesario.

b) Fundir la grasa a ensayar a 60° C, por tratarse en nuestro caso particularmente de grasa de cerdo. Filtrar.

c) Colocar 50 gs. de grasa fundida y filtrada en cada balón Kjeldahl.

d) Conectar un extremo de un colector de vidrio a la línea de vacío y el otro extremo a la cámara de auto llena de oxígeno.

e) La cámara de auto se llena con el oxígeno de un cilindro y se obtura con una llave.

f) Se conecta el colector al in-

dicador de presión y a la bomba de vacío.

g) Se hace un vacío de 25 pulgadas durante tres minutos sobre los Kjeldahl.

h) Se cierra el vacío y lentamente se abre la conexión a la cámara de auto llena de oxígeno, hasta que el vacío retorne a cero.

j) Se repiten las operaciones g y h tres veces.

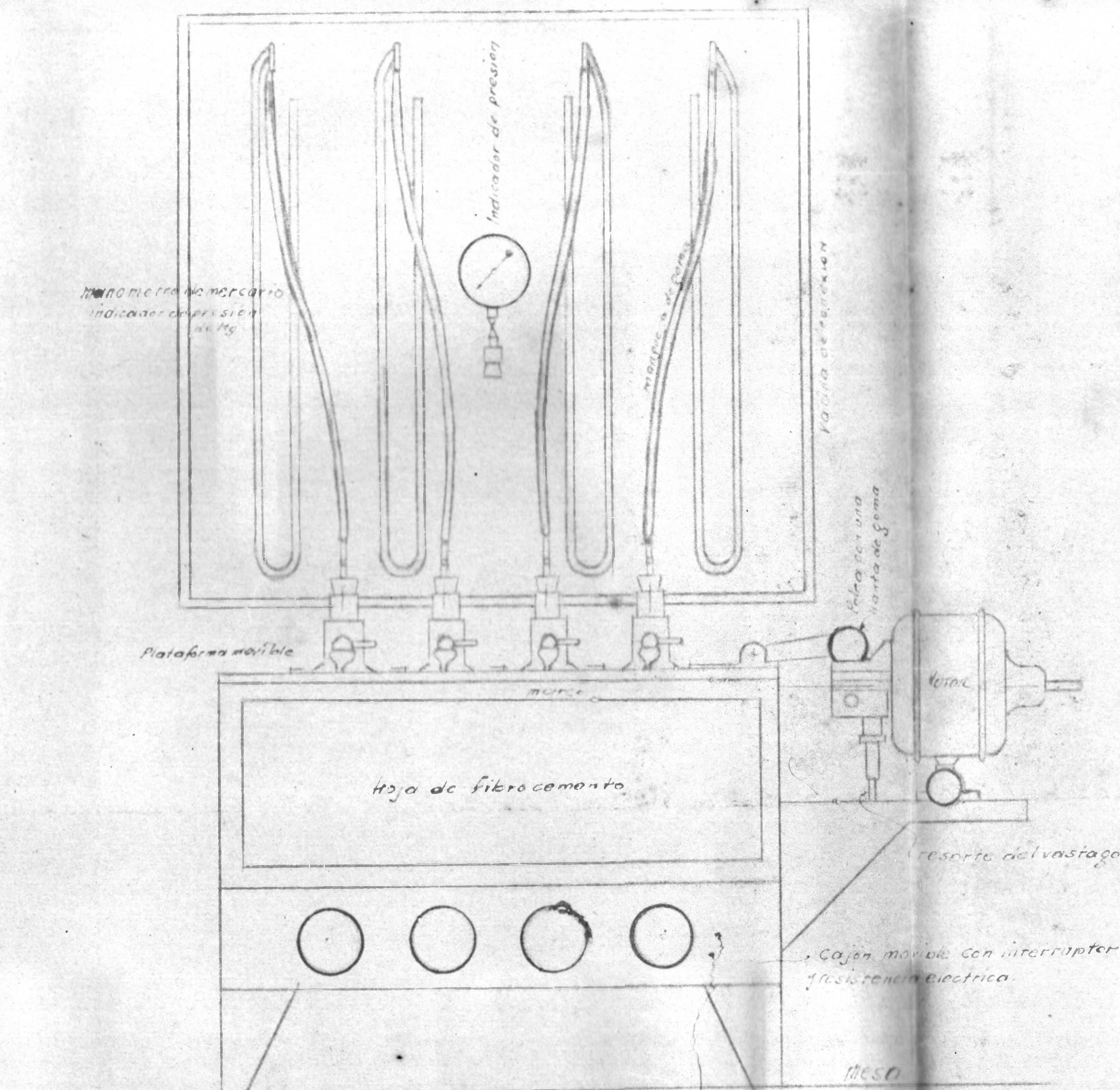
k) Se saca el colector de vidrio y sin demora se conecta cada kjeldahl a su manómetro por medio de una unidad consistente en un tapón de goma, un tubo y una manguera de goma. El tubo de goma tiene una llave T (ver esquema adjunto).

l) Se abre T y se pone en movimiento la plataforma movable. El objeto de abrir T es que no exista ninguna presión de oxígeno en el Kjeldahl, lo que se comprueba cerrando T y observando las dos ramas del manómetro de mercurio. Esta operación lleva cerca de 20 minutos.

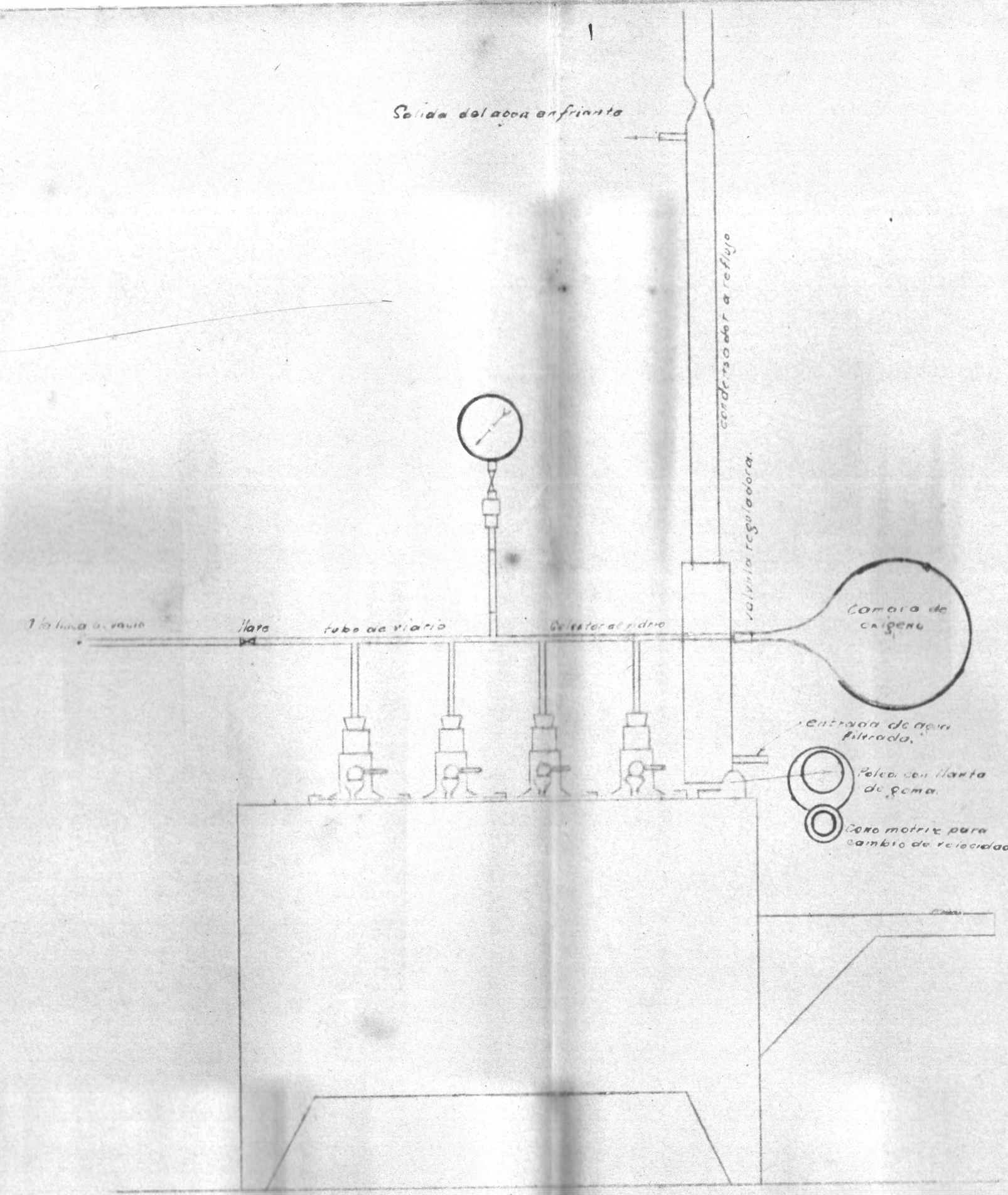
n) Se hacen lecturas a intervalos fijos, que dependen del desarrollo de presión negativa por: lecturas de 30 minutos cuando no se registra ninguna absorción y lecturas cada 10 minutos tan pronto como la presión negativa se pone de manifiesto. Nosotros hemos dejado abierto T durante 20 minutos, con lo que se elimina la posibilidad de que exista alguna presión en el Kjeldahl y después de haber cerrado T, se hicieron lecturas manométricas cada 10 minutos.

NOTA: Llamamos presión negativa a la disminución de presión que tiene lugar en el Kjeldahl, a causa de la absorción de oxígeno.

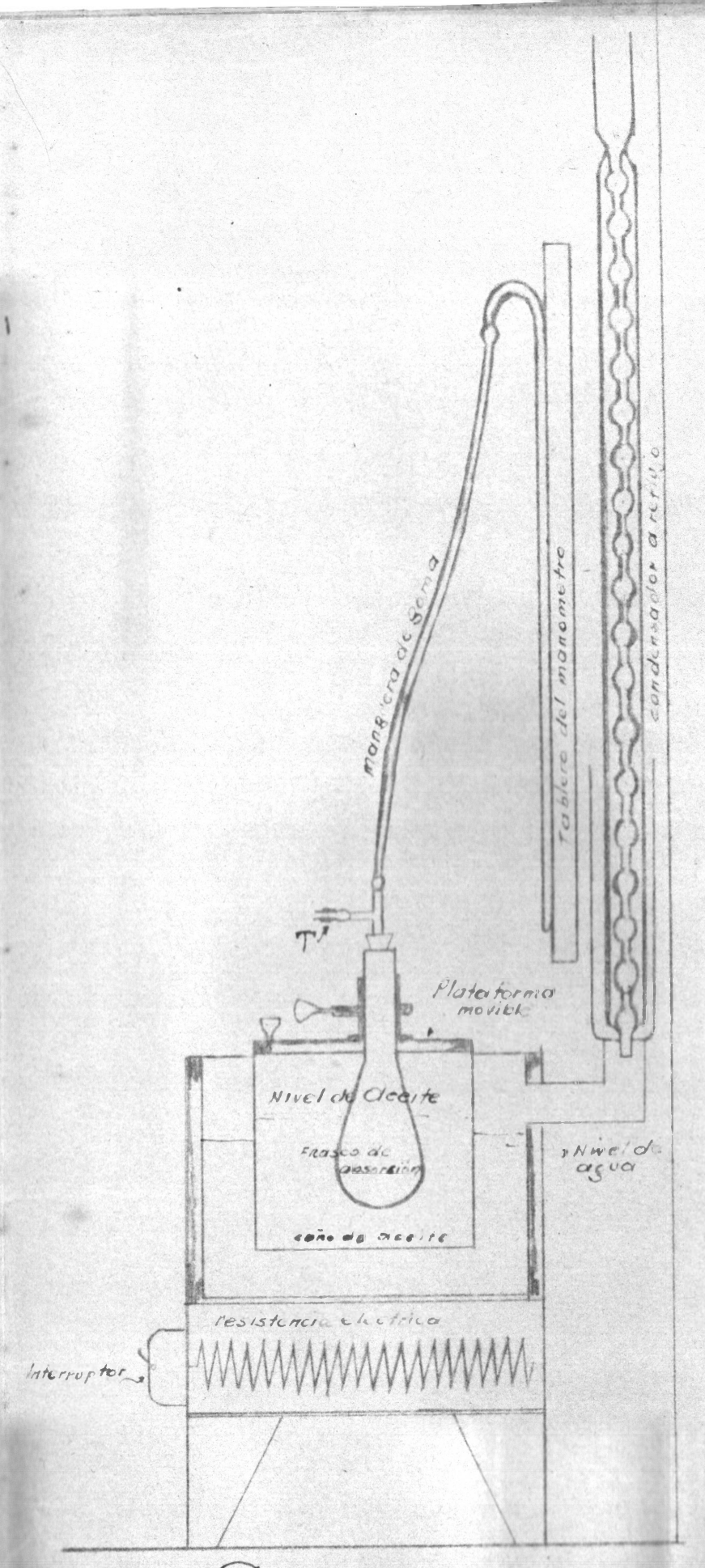




VISTA DE FRENTE DEL APARATO para medida del vacío.

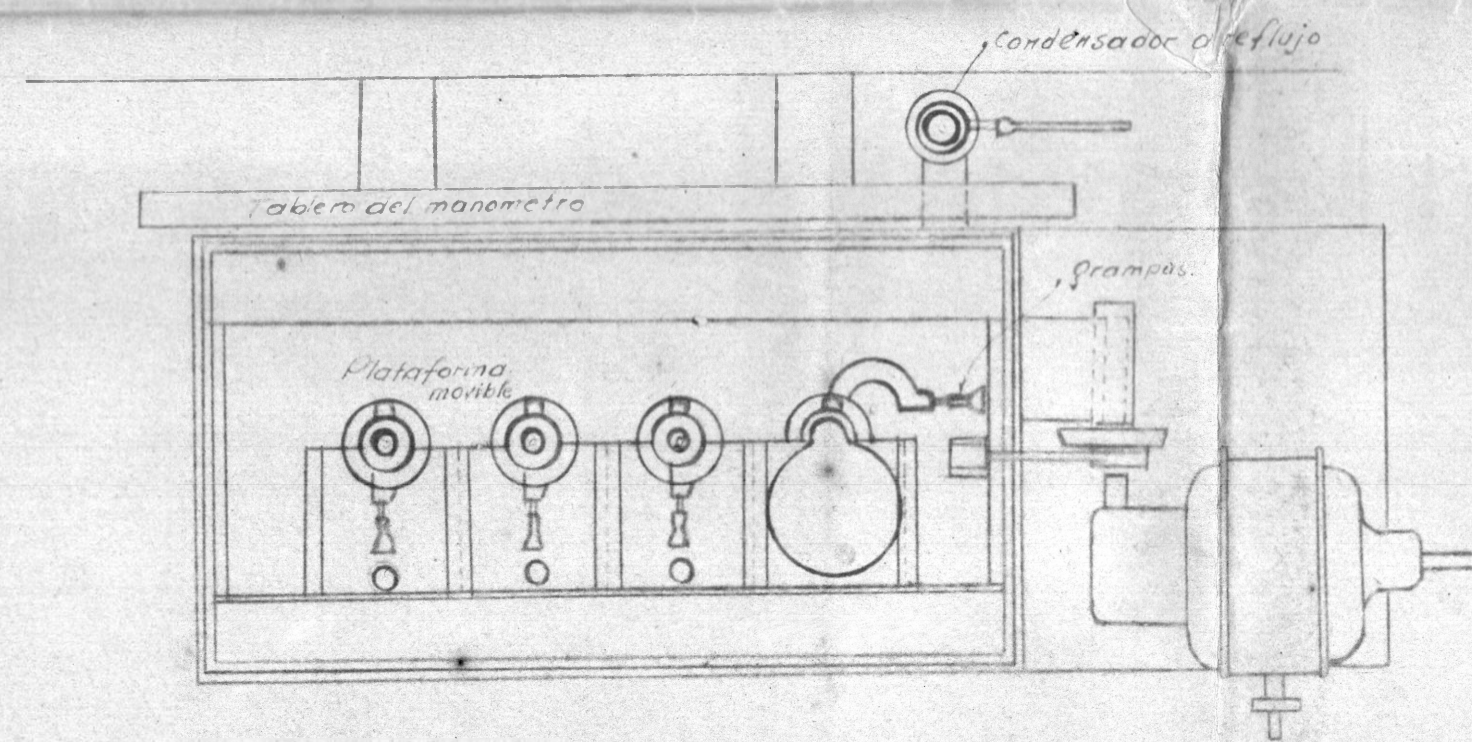


VISTA DE FRENTE DEL APARATO PREPARADO PARA MEDIDA DEL VACÍO Y CARGA DE OXÍGENO

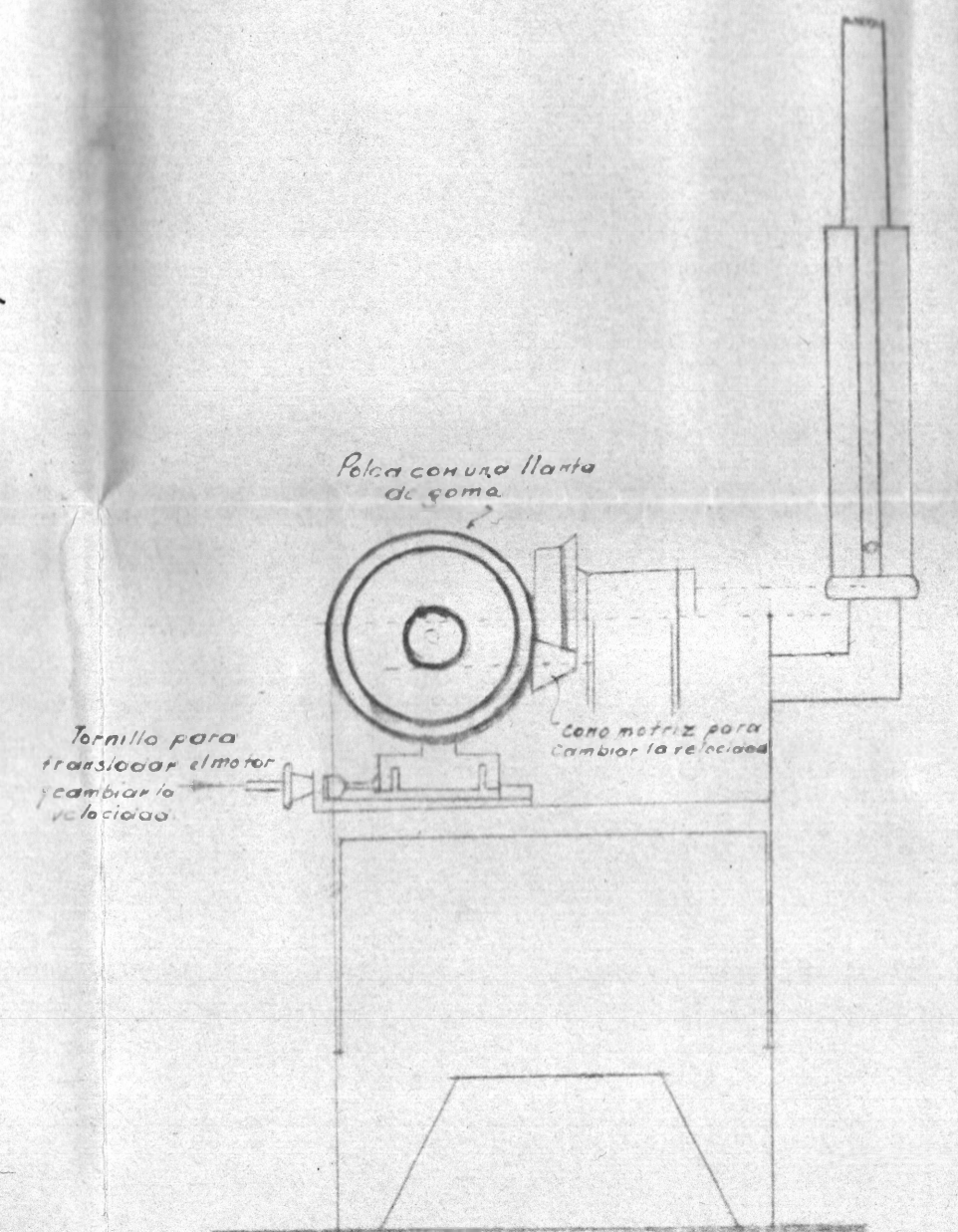


SECCION TRANSVERSAL.

## ~ METODO DE ABSORCION DE OXIGENO ~



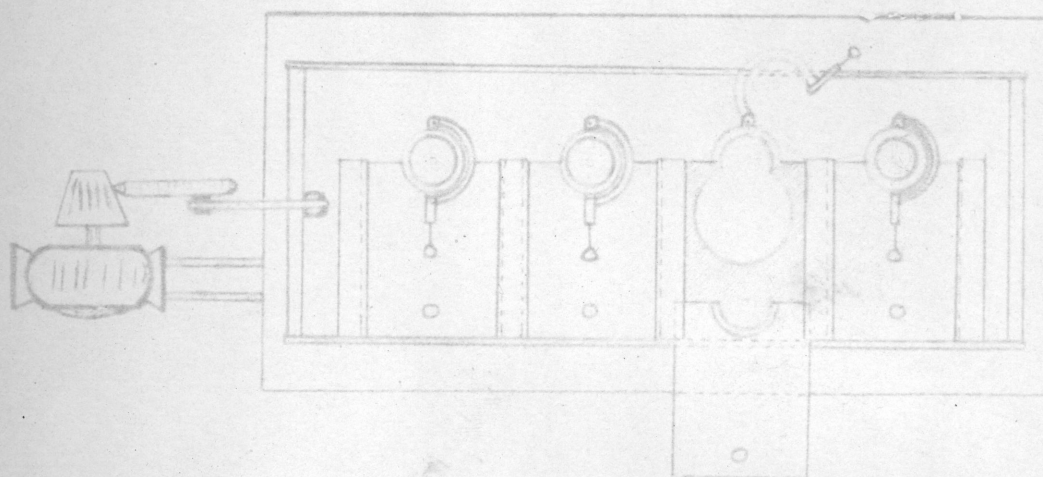
VISTA DE ARRIBA.



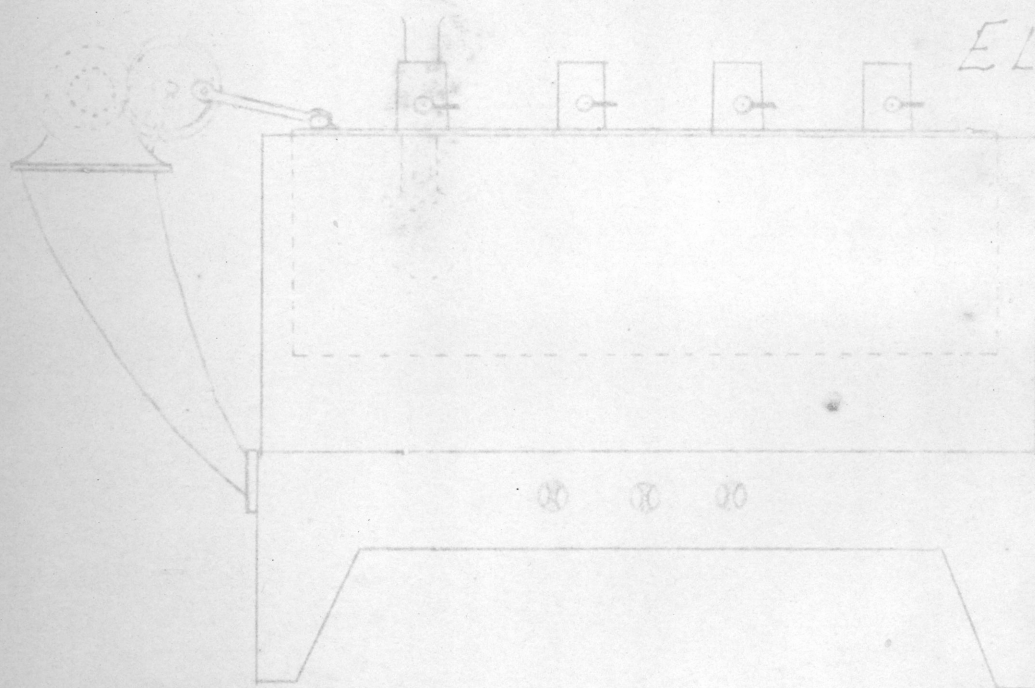
VISTA DE COSTADO.



PLANTA.



ELEVACION



METODO DE ABSORCION DE OXIGENO.

o) La limpieza del material utilizado ya sea de los Kjeldahl, vasos de precipitación en que se pesa la grasa etc, es de fundamental importancia. Primeramente se lavó el material con agua jabonosa y con municiones y después con una solución sulfocrómica bastante concentrada.

A pesar de haberse enjuagado con mucho esmero, los duplicados de los ensayos no coincidían, pareciendo que algo de mezcla sulfocrómica quedaba, la cual oxidaba la grasa. Se dedujo que la mezcla sulfocrómica no era aconsejable para el lavado del material, más aún si consideramos nuestro caso, en que utilizamos un método de absorción de oxígeno. Finalmente se preparó una solución alcalina para el lavado, constituida por las siguientes sustancias:

Pirofosfato de sodio:	140 gramos
Carbonato de sodio :	225 gramos
Fosfato de sodio :	500 gramos
Metasilicato de Na :	40 gramos
Santomerse N°1 (dodecil bencen sulfonato de sodio, que es un detergente):	25 gramos

Se mezclan las cantidades de reactivos indicadas en un mortero, se tamiza para facilitar bien la mezcla y luego se prepara una solución al 10% que se emplea para lavar el material.

La limpieza se realiza del siguiente modo: se lava el material con agua jabonosa caliente y con municiones, lo mejor posible, se enjuaga, y después con la solución alcalina hirviendo hasta que las burbujas jabonosas formadas cu-

bran toda la superficie del material. Esto se hace tres veces, después se enjuaga con agua destilada hasta eliminar la solución alcalina, se escurre muy bien ésta, y se coloca todo el material así limpiado en una estufa, porque éste debe ser utilizado completamente seco.

Trabajando de esta manera se elimina el peligro de la oxidación de la grasa, que se presenta cuando se usa una mezcla sulfoocrómica, y así los ensayos hechos por duplicado coinciden.

#### Preparación de las curvas:

Se llevan los milímetros de presión negativa como ordenadas (0 a 200 mm) y los minutos como abscisas (0 a 300 minutos para la grasa de cerdo). Se adjuntan dos curvas, la de control (80 minutos) y la que posee mayor estabilidad (560 minutos).

El objeto de nuestro trabajo en su primera parte consiste en ver la acción antioxidante del aceite de germen de trigo. Primeramente se determinó la estabilidad de la grasa de cerdo a ensayar, para tomarla como control, a la que corresponde una estabilidad de 80 minutos.

Por no haber producción local, se usó grasa de cerdo comestible, producida en Villa Gobernación Gálvez, Pcia. de Santa Fe. Nos basamos en el trabajo de R.W. Riemenchneider, J. Turer y Waldo C. Ault (21).

Sabemos que existen substitutos de la manteca, que consisten en mezclas de grasas animales y vegetales. La composición de estos productos varía considerablemen-



# Método de absorción de oxígeno

GRASA-DE CEREO (CONTROL)

○ Punto de rotura.

Presión negativa  
mm. de Hg.

100

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

minutos

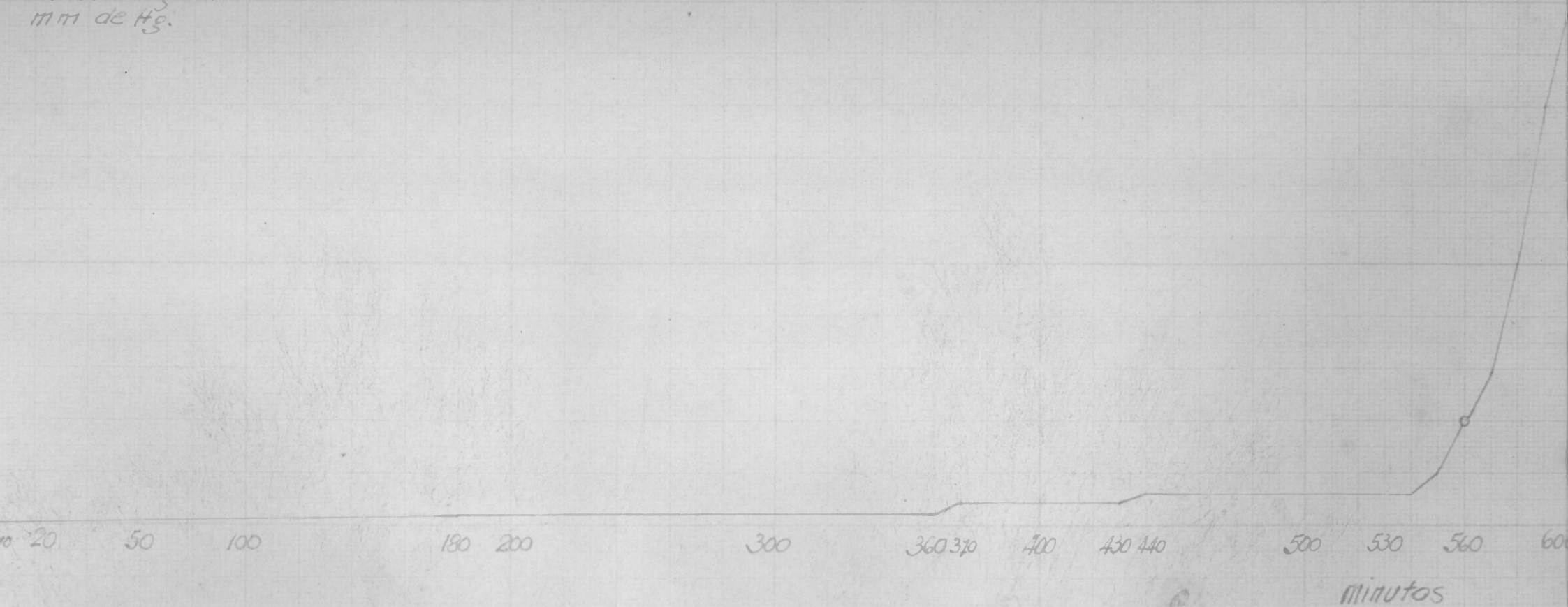


# METODO DE ABSORCION DE OXIGENO

GRASA DE CERDO MAS 3% DE ACEITE DE GERMEN DE TRIGO

○ Punto de ruptura.

Presión negativa  
mm de Hg.





te de tiempo en tiempo, dependiendo esto de la relativa aprovechabilidad y precio de sus componentes.

Puesto que el interés comercial en estas grasas compuestas se ha concentrado alrededor de sus ventajas económicas no pudo darse suficiente atención a la posibilidad de mejoramiento de la estabilidad de las grasas animales mediante mezclas con porcentajes relativamente pequeños de ciertos aceites vegetales.

Se sabe que en general, las mantecillas preparadas por hidrogenación de aceites vegetales son algo más resistentes a la rancidez que las grasas animales.

Trabajos previos (11), (16) han indicado que algunos de los aceites vegetales comunes deben su estabilidad principalmente a la presencia de tocoferoles naturales.

El aceite de germen de trigo contiene cerca de 0,3 a 0,5 gs. por ciento de tocoferoles (22), (23), (24); además los aceites de maíz, algodón, soya contienen de 0,1 a 0,2 gs. por ciento, mientras que el de oliva 0,008 gs. por ciento (25).

En diferentes especies, pueden producirse variaciones considerables. Además el tratamiento de refinación, generalmente reduce el contenido de tocoferoles de un aceite.

Se ha demostrado que la adición de una mínima cantidad de tocoferoles (0,01 a 0,001 gs. por ciento de grasa) produce un aumento notable en la estabilidad de la

grasa de cerdo. Concentraciones de esa magnitud pueden introducirse fácilmente en la grasa de cerdo por mezcla directa con cantidades relativamente pequeñas de aceites ricos en tocoferoles.

Aunque en 1926 Anderegg y Nelson (7) informaron que el aceite de germen de trigo protege las grasas no saturadas en mezclas diariamente preparadas, y a pesar de que este hallazgo fué confirmado en 1931 por Roller, comparativamente se ha publicado poco referente al mejoramiento de la estabilidad de la grasa de cerdo, causada por la adición directa de aceites vegetales.

En vista del conocimiento concerniente a la acción antioxidante de los tocoferoles, incluyendo el concepto de sinergismo propuesto por Olcott y Mattill y además estudiados por otros (26), fué considerado conveniente analizar e investigar, el efecto de la adición del aceite de germen de trigo en la grasa de cerdo.

Nosotros hemos usado un aceite de germen de trigo extraído por solvente, el que fué cedido gentilmente por el Dr. Oscar Raúl Vera. Su contenido en tocoferoles totales fué determinado por el método de Parker McFarlane, modificación del método de Emmerie Engel (27) y adoptado al fotómetro de Pullfrich por el Dr. Vera (28) debido a la carencia de colorímetro fotoeléctrico en nuestro medio.

Se creyó conveniente hacer un resumen del método utilizado en la determinación de los tocoferoles totales del aceite de germen de trigo. El fundamento del

mismo consiste en la oxidación de los tocoferoles presentes en el aceite vegetal por el  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , el cual se reduce a ión ferroso, que al complejarse con el  $\alpha\alpha'$  dipiridilo desarrolla una coloración roja.

El complejo formado es según Snell (29) y Mellan (30)  $\text{Fe} \left[ (\text{ClOH}_8\text{N}_2)_3 \right] \text{X}_2$ , donde X es un radical ácido monovalente, es decir un ión  $\text{Fe}^{++}$  y tres dipiridilo.

Se hace una extracción en Soxhlet del aceite de germen de trigo con un éter de petróleo y en el mismo matraz del aparato se evapora el solvente. Para ello se tapa dicho matraz con un corcho con dos perforaciones: una donde llega nitrógeno puro y otra atravesada por un tubo acodado para la salida de los vapores del solvente.

En el mismo disco eléctrico de calentamiento del Soxhlet se realiza la evaporación del solvente. Para ello se hace circular lentamente  $\text{N}_2$  puro (99,9%), que desaloja el aire del matraz y arrastra luego durante el calentamiento los vapores del éter de petróleo. Se continúa el calentamiento, manteniendo una ebullición suave del solvente, necesitándose para esta operación menos calor que el necesario durante el funcionamiento del aparato. Sabemos que el solvente ha sido eliminado totalmente, cuando ya no se forman burbujas en el aceite.

Al quedar el aceite tranquilo se hace pasar una corriente rápida de  $\text{N}_2$  para desalojar el posible solvente que haya condensado en la parte superior del matraz. Se deja enfriar y se pesa. Se hace una solución en nafta, de alrededor de 1,7% y allí se valoran los tocoferoles. Para ello se colo-

can en un tubo de centrifuga con tapa esmerilada de unos 10 ml, 7 ml de la solución del aceite en nafta de p.Eb. 120-140° C purificada con  $\text{SO}_2\text{H}_2$ , se le agrega 2 ml de  $\text{SO}_2\text{H}_2$  al 85% en peso y se agita lentamente hasta que el precipitado pardo precipita rápidamente.

Así se consigue destruir las dobles ligaduras de los carotenoides que reducen al ión férrico (27) y (31). Se centrifuga, se decanta, se agita con KOH y se vuelve a centrifugar. Se toma 2,7 ml de la solución así preparada y con ella se hace la reacción de valoración: se le agrega 1 ml de solución de dipiridilo al 4% (disuelto en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial), 1 ml de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  al 2% (disuelto en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial) y alcohol etílico purificado por destilación sobre  $\text{MnO}_2$  y KOH hasta 10 ml. Simultáneamente se prepara el líquido de compensación, reemplazando los 2,7 ml de la solución del aceite por 2,7 ml de nafta. Se determina en el fotómetro de Pullfrich el coeficiente de extinción E, y con él se va a la curva de E-mg de tocoferoles donde se tiene el contenido en tocoferoles de los 2,7 ml de la solución de aceite. El aceite contenía 2,8 gs. de tocoferoles totales por kilogramo de aceite. En la Tabla N° III se dan los resultados de las experiencias realizadas.

T A B L A    N° I I I

Efecto de las mínimas cantidades de tocoferoles contenidos en el  
aceite de germen de trigo, sobre la estabilidad de la grasa de cerdo

<u>Concentración de</u> <u>aceite en la gra-</u> <u>sa de cerdo.</u>	<u>Contenido en</u> <u>tocoferoles</u> <u>del aceite (a)</u>	<u>Estabilidad</u>	<u>Aumento</u> <u>en la es-</u> <u>tabilidad</u>	<u>Factor</u> <u>de esta-</u> <u>bilidad</u> <u>(b)</u>
--	--	--------------------	--	--

<u>%</u>	<u>gramos</u>	<u>minutos</u> <u>80</u>	<u>minutos</u>	<u>1,0</u>
0,01	0,000028	120	40	1,5
0,1	0,00028	150	70	1,9
0,5	0,00140	210	130	2,6
1,0	0,0028	280	200	3,5
1,2	0,00336	320	240	4,0
1,4	0,00392	340	260	4,25
2,0	0,0056	370	290	4,60
2,8	0,00784	410	330	5,10
3,0	0,0084	560	480	7,00
3,2	0,00896	450	370	5,60
4,0	0,0112	450	370	5,60
6,0	0,0168	440	360	5,50
8,0	0,0224	430	350	5,30

Observando la tabla anterior podrá constatarse que al llegar a un agregado del 3% de aceite de germen de trigo, la estabilidad alcanza un máximo que corresponde a una cantidad de tocoferoles totales de 0,0084 gs. por ciento de grasa de cerdo.

Este hallazgo está en concordancia con informaciones en la literatura de que la eficiencia de los tocoferoles como antioxidantes disminuye con el aumento de concentración (26), (32) y (33).

Con los datos obtenidos de la Tabla Nº III se construyó un gráfico, en el que en las abscisas se representa la concentración en gramos de aceite de germen de trigo por ciento de grasa de cerdo y en las ordenadas la estabilidad referida en horas.

- (a) Contenido en tocoferoles totales del aceite determinado por el método de Parker Mc. Farlane, modificación del de Emmerie Engel y adoptado al fotómetro de Pullfrich por el Dr. Vera.
- (b) Estabilidad de la grasa tratada sobre la estabilidad de la grasa no tratada.



— ACCIÓN ESTABILIZANTE DEL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO. —

Estabilidad  
en horas

15

10

5

0

0.01 0.1

0.5

1

1.2

1.4

1.5

2

2.5

2.8

3

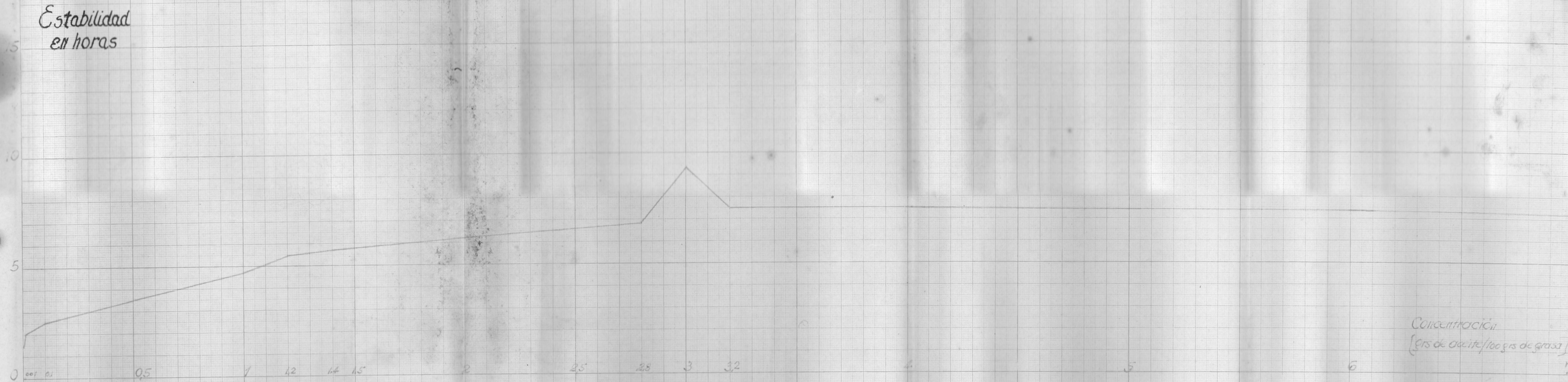
3.2

4

5

6

Concentración  
(grs de aceite/100 grs de grasa)





### - C A P I T U L O   I I I -

Acción sinérgica del ácido cítrico sobre los  
tocoferoles contenidos en el aceite de germen  
de trigo.

Ya conocemos de acuerdo a lo explicado en la Introducción, la acción sinérgica de ciertos ácidos orgánicos e inorgánicos sobre los antioxidantes fenólicos, en nuestro caso, los tocoferoles que se encuentran en el aceite de germen de trigo.

Por esa razón se consideró inmediatamente el problema de encontrar una sustancia acidica, la que mejoraría y acrecentaría la actividad del aceite de germen de trigo.

Golumbic y Matill (34) demostraron el sinergismo del ácido ascórbico con tocoferol, y también se comprobó que los ácidos tartárico y cítrico son definitivamente superiores al ácido maleico en la estabilización de ésteres de aceite de algodón hidrogenado.

El ácido cítrico tiene la ventaja sobre el ácido tartárico de ser apreciablemente más soluble en solventes grasos (35).

El problema que se presentó inmediatamente fué la manera de disolver el ácido cítrico en el aceite de germen de trigo. Después de varias tentativas se llegó a solubilizarlo de acuerdo al método seguido por R.A.Chapman y W.D.Mc.Farlane, quienes aplicaron la mezcla de aceite de germen de trigo y ácido cítrico al mejoramiento de la estabilidad de la leche en polvo (36).

Reactivos usados:

Acido cítrico: Mallinckrodt Chemical Works, Saint Louis, Montreal, Philadelphia-New York.

Alcohol etílico absoluto: Mattaldi.

Según el método original, se diluía el ácido cítrico en alcohol etílico absoluto, y esta solución se mezclaba perfectamente con la cantidad requerida de aceite de germen de trigo, agitándose entonces la mezcla en un Waring Blendor durante cinco minutos. El alcohol se elimina por vacío.

Se procedió de la siguiente manera: se pesó el ácido cítrico en un vaso de precipitación de 50 ml, previamente tarado, se disolvió en la cantidad mínima posible de alcohol etílico absoluto, se filtró, se recibió el filtrado en otro vaso de precipitación tarado de 100 ml, y se le agregó la cantidad requerida de aceite de acuerdo al ácido cítrico usado, se agitó la mezcla en un agitador, por espacio de cinco minutos, para emulsionarla bien.

La mezcla adquirió un aspecto lechoso y un color mucho más amarillento que el aceite; se pasó ésta a un Erlenmeyer de 250 ml al que se hizo vacío. Para ayudar la evaporación del alcohol se calentó a baño maría al principio, pero al hacer los ensayos de estabilidad se vio que no estabilizaba, lo que significaba que la temperatura alteraba el aceite. Finalmente la evaporación se efectuó agitando continuamente el Erlenmeyer a temperatura ambiente, sin peligro de descomponer el aceite por mucho calentamiento. A medida que se evaporaba el alcohol, se vio que el color del aceite iba variando hasta que al final cuando no eliminaba más alcohol el aceite adquirió su color original.

Este aceite que contenía ácido cí-

trico en diferentes proporciones según los ensayos, se agregó en una concentración del 3% a la grasa de cerdo. Esta concentración que corresponde a un contenido de 0,0084% de tocoferoles totales, es la óptima en que actúa nuestro aceite de germen de trigo para mejorar la estabilidad de la grasa de cerdo, como fué probado en la primera parte de nuestro trabajo.

Se ensayó con 0,1, 0,5, 1, 2 y 3% de ácido cítrico. No fué posible ensayar concentraciones mayores del 3%, por la dificultad de solubilizar el ácido cítrico en el aceite, debido a la gran cantidad de alcohol que debe usarse, lo que hace más difícil su eliminación.

Los resultados de los ensayos están resumidos en la Tabla Nº IV.

T A B L A      N<sup>o</sup> I V.

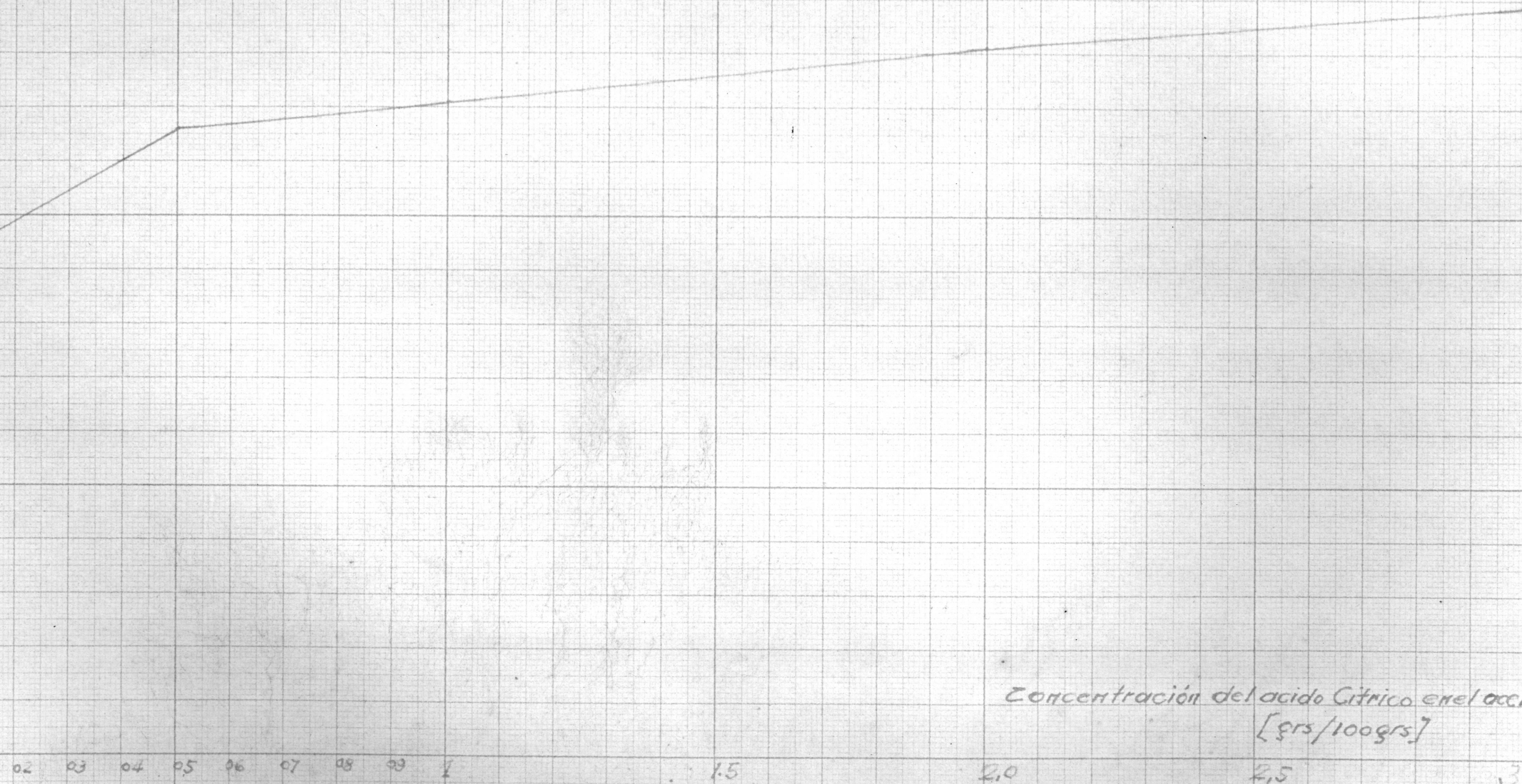
Acción sinérgica del ácido cítrico sobre los tocoferoles contenidos en el aceite de germen de trigo.

<u>Antioxidante agregado:</u> <u>aceite de germen de trigo</u> <u>y ácido cítrico.</u>	<u>Estabilidad</u>  minutos	<u>Aumento de</u> <u>la estabili-</u> <u>dad.</u>  minutos	<u>Factor de</u> <u>protección</u>
	80		1
3% de aceite de germen de trigo	560	480	7,0
3% de aceite con 0,1% de ac.cítrico.	560	480	7,0
3% de aceite con 0,5% de ac.cítrico	700	620	8,75
3% de aceite con 1% de ac.cítrico	730	650	9,10
3% de aceite con 2% de ac.cítrico	810	730	10,10
3% de aceite con 3% de ac.cítrico	830	750	10,30



Estabilidad  
en horas.

# ACCION SINERGICA DEL ACIDO CITRICO SOBRE EL ACEITE DE GERMEN DE TRIGO.



- C A P I T U L O   I V -

Acción del  $\alpha$  tocoferol puro sobre la estabilidad  
de la grasa de cerdo

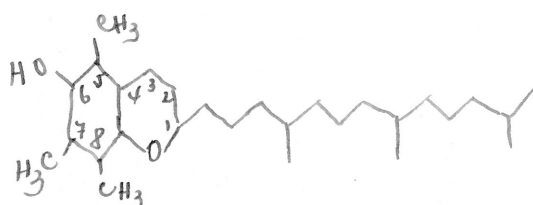
Factor de protección o de estabilidad:

Es la estabilidad de la grasa tratada sobre la estabilidad de la grasa no tratada.

Adjuntamos el siguiente gráfico, en el cual en las abscisas se representa la concentración en gramos del ácido cítrico por ciento de aceite de germen de trigo y en las ordenadas la estabilidad referida en horas.

En la tercera parte de nuestro trabajo se estudió la acción estabilizante del  $\alpha$  tocoferol puro, determinándose la concentración a la cual ejerce su máxima acción.

Se han hallado tocoferoles en una amplia variedad de grasas vegetales, pero no se encuentran generalmente en grasas animales (6). Las observaciones de Oleott y Emerson y últimamente las de Columbia (6), han mostrado que los tocoferoles y compuestos relacionados, funcionan como antioxidantes de las grasas y que son responsables en parte de la mayor estabilidad de las grasas vegetales hacia la deterioración oxidativa. Tres son los tocoferoles existentes en la naturaleza  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La fórmula desarrollada del  $\alpha$  tocoferol es:



Al  $\beta$  tocoferol le falta el grupo metilo del C7. Al  $\gamma$  le falta el grupo metilo del carbono: C5. Los primeros en aislarse fueron el  $\alpha$  y el  $\beta$  por Evans H.M.- Emerson O.H.- y Emerson G.A. (15).

El  $\alpha$  tocoferol es un aceite amarillo pálido, de índice de refracción 1,5052, densidad a 15° C 0,953, soluble en alcohol, éter, grasas, insoluble en agua, débilmente dextrógiro, con absorción máxima en el espectro a 2980° A, resistente al calor, destilable a alto vacío a 200° C. Es muy estable frente al ácido clorhídrico, muy sensible al oxígeno sobre todo en presencia de metales pesados.

Al enranciarse las grasas donde se encuentran disueltos, los peróxidos los descomponen. Al acetilarlo su sensibilidad al oxígeno se elimina y aumenta su actividad biológica.

El  $\beta$  y el  $\gamma$  tocoferoles son muy parecidos al  $\alpha$  en sus propiedades químicas, pero dos veces y media menos activos biológicamente. Los tocoferoles tienen además acción como antioxidantes siendo en tal aspecto el más activo el  $\gamma$ , según Fisher tres veces más que el  $\alpha$ , siendo el  $\beta$  intermedio.

El  $\alpha$  tocoferol puro usado en nuestros ensayos, se compró en ampollas de 5 gs., habiendo sido preparado por Silco Chemical Works, Silco Quality (Origen Estados Unidos de Norte América).

Empezamos los ensayos con un agregado de 0,0084 gs. de  $\alpha$  tocoferol por ciento de grasa de cerdo, cantidad que corresponde a la concentración óptima de tocoferoles totales en el aceite de germen de trigo, utilizado para efectuar la primera parte de este trabajo.

Se observó que a esta concentración, la estabilidad dada por el aparato correspondía a 350 minutos; en cambio con el aceite de germen de trigo se obtuvo un máximo de estabilidad de 560 minutos; lo mismo sucedió con el agregado de 0,016% de  $\alpha$  tocoferol con el que se obtuvo una estabilidad de 390 minutos, menor que la estabilidad conferida por el aceite, que era de 440 minutos.

Esto significaría que a iguales concentraciones de  $\alpha$  tocoferol puro y tocoferoles totales en el aceite, se comportaría mejor el aceite, lo que se explicaría por



el hecho de que en el aceite existen mezclas de los tres tocoferoles presentes en la naturaleza. Ya sabemos que el  $\gamma$  tocoferol es tres veces más activo como antioxidante que el  $\alpha$  tocoferol.

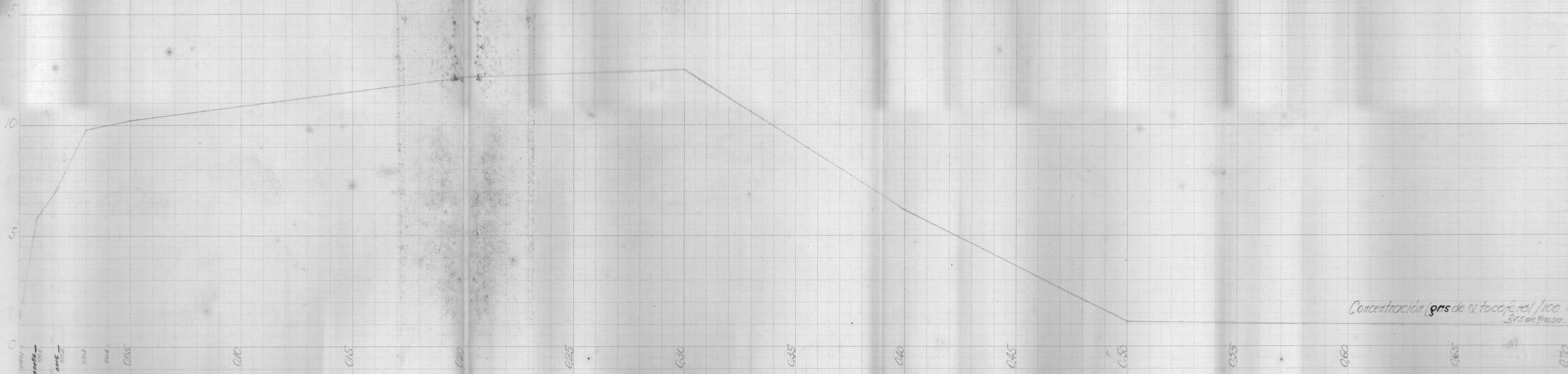
Se ensayó con concentraciones mayores de  $\alpha$  tocoferol puro llegándose a una concentración óptima de 0,2-0,3%. Se vio que después de una concentración de 0,4% de  $\alpha$  tocoferol, las adiciones posteriores de  $\alpha$  tocoferol tenían poco efecto sobre la estabilidad, aún en una concentración del 1%.

En la Tabla N<sup>o</sup> V, se resume los ensayos hechos con el  $\alpha$  tocoferol y al mismo tiempo adjuntamos un gráfico, en el que en las abscisas se representa las concentraciones de  $\alpha$  tocoferol en gramos por ciento de grasa de cerdo y en las ordenadas la estabilidad referida en horas.



Estabilidad  
en horas.

# ACCION ESTABILIZANTE DEL $\alpha$ TOCOFEROL.





T A B L A      N<sup>o</sup> V

Acción del  $\alpha$  tocoferol puro sobre la estabilidad de la grasa de cerdo.

<u>Concentración de</u>	<u>Estabilidad</u>	<u>Aumento de la</u>	<u>Factor de pro-</u>
<u><math>\alpha</math> tocoferol en</u>		<u>estabilidad</u>	<u>tección o es-</u>
<u>la grasa de cerdo.</u>			<u>tabilidad.</u>

gramos	minutos	minutos	
_____	80	_____	1
0,0084	350	270	4,3
0,016	390	310	4,8
0,03	590	510	7,3
0,05	610	530	7,6
0,20	730	650	9,1
0,30	750	670	9,3
0,40	370	290	4,6
0,50	70	_____	_____
0,70	50	_____	_____
1,00	50	_____	_____

Factor de protección o de estabilidad:

Es la estabilidad de la grasa tratada sobre la estabilidad de la grasa no tratada.

Finalmente acompañamos un gráfico en el que se representan las tres curvas correspondientes

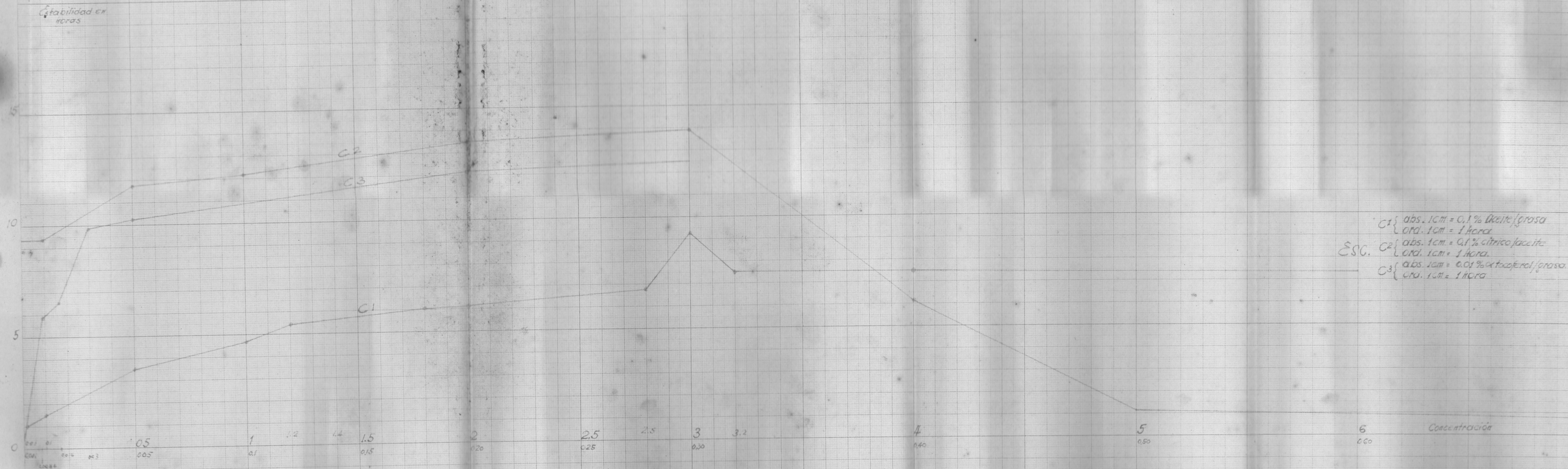


## METODO DE ABSORCION DE OXIGENO.

La curva en rojo nos expresa las estabildades de la grasa en distintos porcentajes de aceite de germen de trigo.

La curva en azul nos expresa las estabildades de la grasa con 3% de aceite para distintos porcentajes de acido cítrico.

La curva en verde nos expresa las estabildades de la grasa con distintos porcentajes de el tocoferol.





a los ensayos realizados.

Estos resultados están de acuerdo con informaciones dadas en la literatura, que dicen que con más altas concentraciones del 0,2% de  $\alpha$ -tocoferol, la estabilidad de la grasa de cerdo comienza a disminuir y se apresura la llegada de rancidez organoléptica (33) y (37).

También Calvin Columbus demostró que las adiciones de grandes cantidades de  $\alpha$ -tocoferol a las grasas vegetales que ya contienen cantidades substanciales de tocoferoles como constituyentes naturales aumenta la acumulación de peróxidos y acorta el período de inducción. La concentración óptima de  $\alpha$ -tocoferol para la estabilización de cualquier grasa no puede ser así establecida categóricamente por la posible existencia de otros inhibidores naturales y otros variables.

Según estas observaciones, los resultados paradójicos de Obcott y Matill encuentran una explicación probable; estos autores hallaron que los concentrados de inhibidores eran ineficaces como antioxidantes de las grasas vegetales de que se extraen. Resulta ahora evidente que en tales grasas, "los tocoferoles ya ejercen su máxima acción antioxidante y que mayores adiciones de ellos producen una disminución en la estabilidad".

La demostración que la actividad máxima antioxidante de los tocoferoles está relacionada a su concentración pone en pie esta interesante pregunta:

¿Es puramente fortuito el conte-

nido en tocoferoles de las grasas vegetales o está regulado por el proceso metabólico de las plantas, para suministrar así la máxima estabilidad de la grasa?

No se puede adelantar todavía ninguna respuesta a esta pregunta, pero, si fuera cierta la primera posibilidad, resultaría que algunas grasas vegetales pueden contener tocoferoles más que suficientes para asegurar la máxima protección contra la autooxidación.

- CAPITULO V -

Algunos ensayos de almacenaje.



Con el fin de completar el estudio de la acción antioxidante del aceite de germen de trigo sobre la grasa de cerdo se hicieron algunos ensayos de almacenaje, para ver si a través del tiempo variaba o no la estabilidad conferida por el aceite y dada por el aparato.

Para ello nos hemos basado en el trabajo de Reimenschneider y Speck (38) y (39).

Se utilizaron frascos de vidrio de 6 cm. de diámetro externo y 10 cm. de alto, con tapas metálicas a rosca. Se colocó en cada uno de ellos 100 gs. de grasa de cerdo con las distintas concentraciones de aceite de germen de trigo que se utilizaron en la primera parte de nuestro trabajo, hasta una concentración del 3%, que era la más eficaz. Los frascos se cerraron herméticamente y fueron colocados en un refrigerador de modo que la muestra congelara rápidamente.

Después de ser enfriados toda la noche fueron colocados en una caja de cartón para protegerlos de la luz, y almacenados en una habitación cuya temperatura oscilaba entre 21 y 22° C, se tomó la temperatura durante los tres meses que duró la experiencia obteniéndose un promedio de 21,8° C; la humedad relativa que se tomó con un higrómetro de Taylor fué de 75%. El método original aconseja una temperatura de 21,1° C y una humedad relativa de 65%.

Después de unas pocas horas de almacenados en esa habitación la tapa atornillada de los frascos se aflojó cerca de la mitad para permitir alguna difusión de aire en los mismos.

Al cabo de tres meses de estar almacenados en esas condiciones, las muestras fueron ensayadas en el aparato de absorción de oxígeno. Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla N° VI.

T A B L A    N° V I.

Variación de la estabilidad con el tiempo.

<u>Concentración</u> <u>del aceite en la</u> <u>grasa de cerdo.</u>	<u>Estabilidad</u> <u>inicial</u>	<u>Estabilidad a</u> <u>los tres meses</u>	<u>Disminución</u> <u>en la</u> <u>estabilidad</u>
gramos	minutos	minutos	minutos
<u>          </u>	80	40	40
0,01	120	40	80
0,1	150	60	90
0,5	210	80	130
1,0	280	80	200
1,2	320	80	240
1,4	340	80	260
2,0	370	90	280
2,8	410	120	290
3,0	560	190	370

Los ensayos se hicieron por duplicado. Acompañamos un gráfico, en el que en las abscisas se representan las concentraciones en gramos de aceite de germen de trigo por ciento de grasa y en las ordenadas la estabilidad en horas. Se observan dos curvas: la que representa las estabilidades de la grasa de cerdo <sup>mi</sup>determinadas inmediatamente, y la de las estabilidades de la misma grasa de cerdo después de tres meses de almacenamiento.

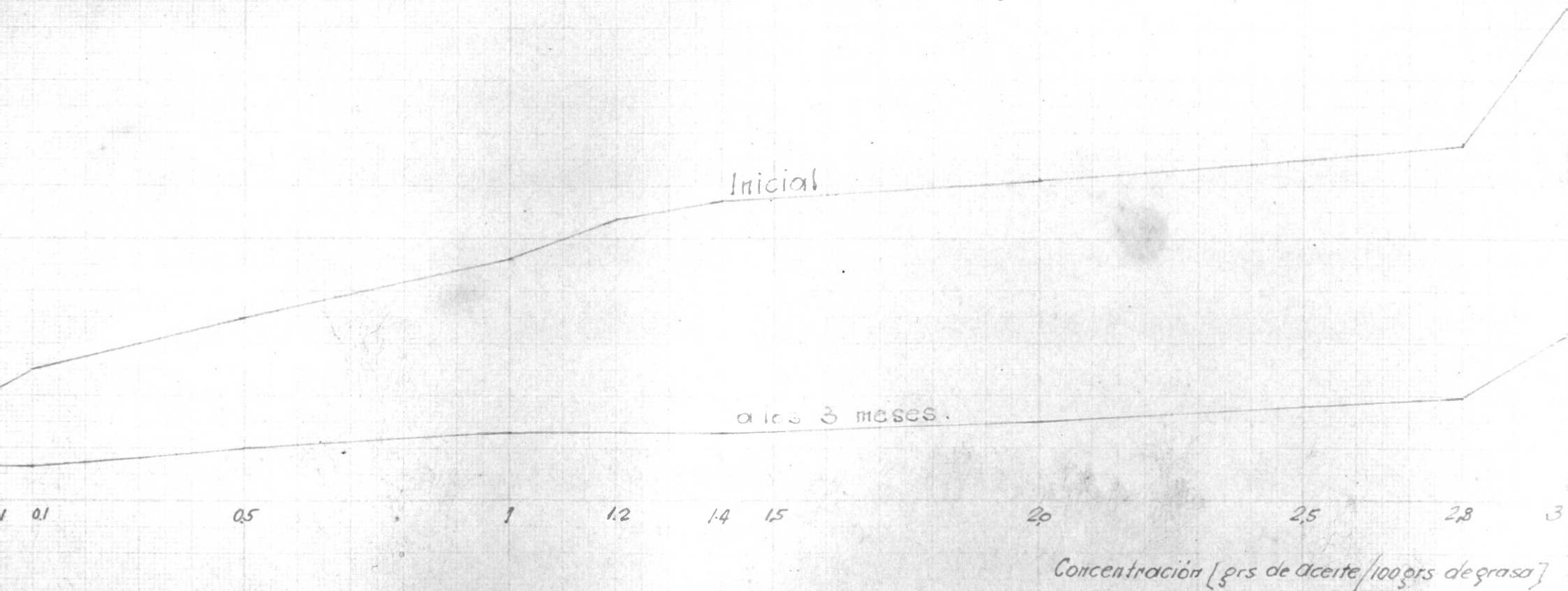
Se ve que las estabilidades conferidas por el aceite de germen de trigo disminuyen con el tiempo, lo que significa que los tocoferoles dan mayores estabilidades por métodos acelerados (estabilidad inicial) que por los ensayos de almacenaje (estabilidad a los tres meses).

La diferencia entre los resultados de los ensayos rápidos, y los de almacenaje parece aumentar cuando se agrega concentrado de tocoferoles y lecitina a la grasa de cerdo (38) y (39).

En la mayoría de los casos en que se usaron antioxidantes, el factor de protección, determinado por el ensayo rápido de estabilidad, resultó mayor que el que se halló en el ensayo de almacenaje (38) y (39).

# .. VARIACION DE LA ESTABILIDAD CON EL TIEMPO..

ESTABILIDAD  
EN HORAS.



### CONCLUSIONES

De acuerdo a las experiencias realizadas, se pueden extraer las siguientes consideraciones generales:

1).- Utilizando el aceite de germen de trigo como antioxidante, se obtiene la máxima estabilidad (de 80 a 560 minutos) sobre la grasa de cerdo, cuando se agrega un 3% en peso de aceite.

2).- La acción sinérgica del ácido cítrico queda probada, y su concentración óptima es del 3% (de 80 a 830 minutos).

Resulta además difícil obtener concentraciones mayores del 3%, a causa de las dificultades para solubilizar el ácido cítrico.

3).- Los agregados de  $\alpha$  tocoferol puro en las mismas concentraciones que se consiguen con el aceite prueban que el aceite es más eficaz, como se puede deducir de la posible existencia de  $\beta$ ,  $\gamma$  tocoferoles y otros inhibidores naturales en el mismo.

No es práctico efectuar comprobaciones con una concentración mayor del 0,016% de  $\alpha$  tocoferol, ya que ello obligaría a agregar grandes cantidades de aceite de germen de trigo.

4).- Las mayores estabilidades con el agregado de  $\alpha$  tocoferol puro se consiguen con 0,2 - 0,3%.

5).- Los ensayos de almacenaje permiten deducir que con la acción del tiempo disminuye el efecto antioxidante del aceite.

6).- Los datos obtenidos concuerdan con los de la bibliografía, De ello se deduce que los aceites de germen de trigo argentino tienen propiedades antioxidantes semejantes a los extranjeros.

*Oswaldo Ruzaldi*



B I B L I O G R A F I A

- 1) B.W.Beadle.Oil and Soap 23(1946)33.
- 2) C.H.Lea. Rancidez en grasas comestibles - 1939.
- 3) R.W.Riemenschneider,F.E.Suddy,S.F.Herb y J.Turer.Oil and Soap 22(1945)171-77.
- 4) H.A.Mattill,Blanche Crawford.Ind.Eng.Chem 22(1930)341.
- 5) H.S.Olcott y H.A.Mattill.J.Biol Chem 93(1941)65.
- 6) H.S.Olcott y H.A.Mattill.J.Americ Chem 58(1936)1627.
- 7) I.T.Anderegg y V.E.Nelson.Ind Eng.Chem 18(1926)620.
- 8) H.S.Olcovich y H.A.Mattill.J.Biol Chem 91(1931)105.
- 9) Elizabeth M.Bradway y H.A.Mattill.J.Americ Chem Soc.56 (1934)2405.
- 10) T.P.Hilditch y J.Sleightholine J.Soc.Chem Ind 39-40-41 (1932)51.
- 11) H.S.Olcott y H.A.Mattill J.Americ Chem Soc 58(1936)2204.
- 12) H.S.Olcott Oil and Soap 18(1941)77.
- 13) H.S.Olcott.J.Biol. Chem 107(1934)471.
- 14) H.S.Olcott.J.Biol Chem 110(1935)695.
- 15) Herbert M.Evans,Oliver H.Emerson y Gladys Emerson.J.Biol Chem 113(1936)319.
- 16) H.S.Olcott y O.H.Emerson J.Americ Chem Soc 59(1937)1008.
- 17) G.S.Fisher.Ind Eng Anal Ed.17(1945)224-27.
- 18) Calvin Golumbic.J.Americ Chem Soc.63(1941)1142.
- 19) King,Roschen and Irwin.Oil and Soap 10(1933)105.
- 20) N.D.Sylvester.Journal of Soc.Chem Product 61(1942)165.
- 21) R.W.Riemenschneider,J.Turer,W.C.Ault.Oil and Soap 21(1944)98-100.

- 22) F.W.Quakenbush.H.L.Gotthet.Harvey Steenbock.Ind Eng  
Che.33(1941)1276.
- 23) Step Kuhman Schroeder "Les Vitamines" 1941.
- 24) Lecoq Compt Rend Soc Biol.138(1944)836-38.
- 25) P.Karrer.H.Keller "Helv Chim Acta"21(1938)951-53.
- 26) C.E.Swift.W.E.Rose.J.S.EJameson.Oil and Soap<sup>19</sup>(1942)176.
- 27) W.E.Parker.W.D.Mc Farlane Canad.Journal of Research 18  
Sect A-B(1940)405.
- 28) Oscar R.Vera."Contenido en tocoferoles del aceite de  
germen de trigo.Tesis año 1947.
- 29) Snell."Colorimetric methods of Analysts" pag.310.
- 30) Mellan. "Organic Reagents in Inorganic Analysis" pag.6.
- 31) H.B.Devlin.H.A.Mattill.W.Bld Chem 146(1942)123-29.
- 32) R.W.Riemenschneider.J.Turer.R.M.Speck.Oil and Soap 20  
(1943)169.
- 33) Calvin Columbie.Oil and Soap 20(1943)105.
- 34) H.A.Mattill.J.Americ Chem Soc 63(1941)1279.
- 35) A.Lips.W.D.Mc Farlane.Oil and Soap 20(1943)193-96.
- 36) R.A.Chapman.W.D.Mc Farlane. Canadian Journal of  
Reasearch 24F(1946)47-60.
- 37) J.D.Oliver.W.S.Singleton.E.Bailley.Oil and Soap 21(1944)188.
- 38) R.W.Riemenschneider.R.M.Speck.Oil and Soap 22(1945)23.
- 39) E.Bickoff.K.Williams.Oil and Soap 23(1946)65.